

대사 추적용 P-32 표지시약의 화학적 합성에 관한 연구

최강혁 · 안병제 · 박을재[†] · 한현수[†] · 유국현*

동국대학교 화학과

[†]한국원자력연구소 동위원소이용연구부

(2005. 3. 24 접수)

Study on the Novel Synthesis of P-32 Labeled Agents for Tracing Metabolism

Kang-Hyuk Choi, Byung-Jae Ahn, Ul-Jae Park[†], Hyon-Soo Han[†], and Kook-Hyun Yu*

Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

[†]Radioisotope Production and Application Division, Korea Atomic Energy Institute, Daejeon 305-353, Korea

(Received March 24, 2005)

요 약. [³²P] γ -ATP와 [³²P] α -dCTP는 대표적 P-32 표지화합물이며, 인산화 시약 또는 여러 RNA나 DNA의 P-32 표지 기질로 사용된다. 이 화합물들은 주로 생화학적 합성법에 의해 합성이 된다. 본 연구실에서는 P-32 표지화합물의 대량생산에 맞는 화학적 합성방법으로, 짝지움 시약인 O-8-(5-chloroquinolyl)-S-phenyl phosphorothiate 을 이용하였다. O-8-(5-chloroquinolyl)-S-phenyl phosphorothiate의 총 합성 수율은 42%이었다. 이를 이용한 [³²P] γ -ATP와 [³²P] α -dCTP의 합성표지수율은 각각 95%, 40%였다.

주제어: [³²P]H₃PO₄, [³²P] γ -ATP, [³²P] α -dCTP, 화학적 합성법, O-8-(5-Chloroquinolyl)-S-Phenyl Phosphorothiate

ABSTRACT. [³²P] γ -ATP (adenosine 5'-[γ -³²P]triphosphate) and [³²P] α -dCTP (deocycytidine 5'-[α -³²P]triphosphate) are representatives of P-32 labeled compounds and used as phosphorylating agents or labeled substrates for several RNA and DNA polymerase reactions. These are usually produced by enzymatic processing. Our studies have been focused mainly on preparing these compounds by chemical processing for mass production. O-8-(5-chloroquinolyl)-S-phenyl phosphorothiate, a coupling agent, is proper for the synthesis of [³²P] γ -ATP and [³²P] α -dCTP. Coupling agent has been prepared in a yield of 42%. [³²P] γ -ATP and [³²P] α -dCTP were prepared in radiochemical yields of 95% and 40%, respectively.

Keywords: [³²P]H₃PO₄, [³²P] γ -ATP, [³²P] α -dCTP, Chemical Method, O-8-(5-Chloroquinolyl)-S-Phenyl Phosphorothiate

P-32 동위원소를 이용한 표지화합물은 생명과학 및 물질대사의 활동을 알기위한 추적자로 이용되며 주로 핵산 형태로 제작되어 사용되고 있다. 가장 많이 이용되는 표지화합물은 [³²P] γ -ATP(adenosine 5'-[³²P]-triphosphate)와 [³²P] α -dCTP(deocycytidine 5'-[α -³²P]-triphosphate)가 있으며, 이러한 표지화합물은 인산표지와 DNA와 RNA의 표지기질로 이용된다. 국내 사용되는 P-32 표지화합물의 양은 2002년도 기준 3526

mCi이며, 전량 해외 수입에 의존하고 있다. 최근에 들어 한국 원자력 연구소에서는 대량 고품질의 P-32가 [³²P] H₃PO₄의 형태로 생산(30 Ci/batch)되고 있으며 표지화합물에 대한 연구가 진행되고 있다.

핵산 형태의 P-32 표지화합물은 동위원소를 핵산의 α 와 γ 위치에 선택적 표지하는 것으로 대부분 생화학적 방법^{2,6}에 의해 생산된다. [³²P] γ -ATP의 생화학적 합성은 Johnson/walseth 방법⁷과 Maxam/gilbert 방법⁸

을 이용하고 있다. [32 P] α -dCTP의 합성은 nucleoside monophosphate kinase 또는 nucleoside diphosphate kinase와 nucleotide kinase를 이용하는 생화학적 합성방법과 삼염화아세트나이트릴(trichloroacetonitrile)을 이용한 화학적 합성을 병행한 방법⁹⁻¹¹이 있다. 이러한 생화학적 합성방법은 효소를 이용하며 실험실에서 소량단위로 직접 제작하여 사용한다. 해산의 화학적 합성은 POCl_3 와 tri-*n*-butylammonium pyrophosphate를 이용하여 삼인산화(triphosphate)를 유도하는 방법¹²⁻¹³이 있다. 뉴클레오시드를 인산화시키는 화학적 방법으로 trichloroethyl phosphate, trichloroethyl phosphate와 quinolyl phosphate를 이용하고 있다.¹⁴⁻¹⁸ 특히, 퀴놀릴기(quinolyl group)는 뉴클레오티드(nucleotide)의 인산기를 보호할 수도 있으며 선택적 이탈기로 작용하기도 한다. 또한 8-인산퀴놀릴(8-quinolyl phosphate)에 페닐설파이드기(phenylsulfide)를 도입하면 두 개의 이탈기를 포함하는 짝지움 시약(coupling agent)이 된다. 이 짝지움 시약은 Fig. 1과 같이 인산을 중심으로 2개의 화합물이 결합될 수 있으며, 선택적 치환이 가능하다. 페닐설파이드기는 Ag^+ 이온에 의해 활성화 되어 쉽게 치환되며, 퀴놀릴기는 Cu^{2+} 에 의해 활성화시켜 치환반

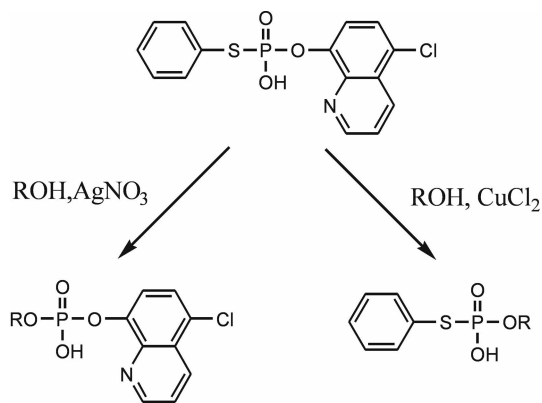
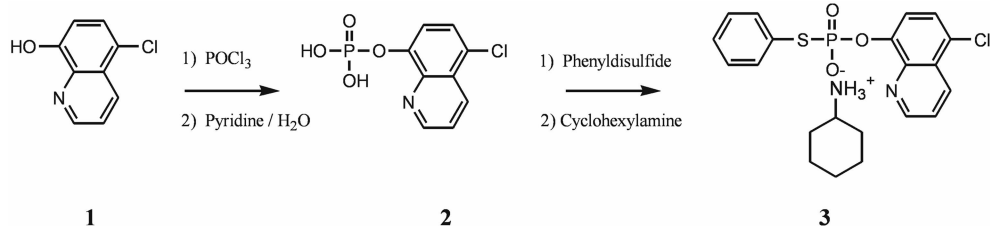


Fig. 1. O-8-(5-chloroquinolyl)-S-phenyl phosphorothiate which contains two leaving group is use as coupling agent.



Scheme 1. Reaction step in the preparation of O-8-(5-chloroquinolyl)-S-phenyl phosphorothiate.

응을 진행한다. 이러한 시약을 이용하여 폴리 또는 다뉴클레오티드 합성에 이용되기도 한다.

그러나 현재까지 화학적 합성을 이용한 P-32 표지 화합물에 관한 실험이 미비한 상태이며 특히, 짝지움 시약을 이용한 P-32 표지 화합물에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구는 짝지움 시약을 이용한 [32 P] γ -ATP와 [32 P] α -dCTP를 합성하였으며 이에 대한 실험 결과를 발표하고자 한다.

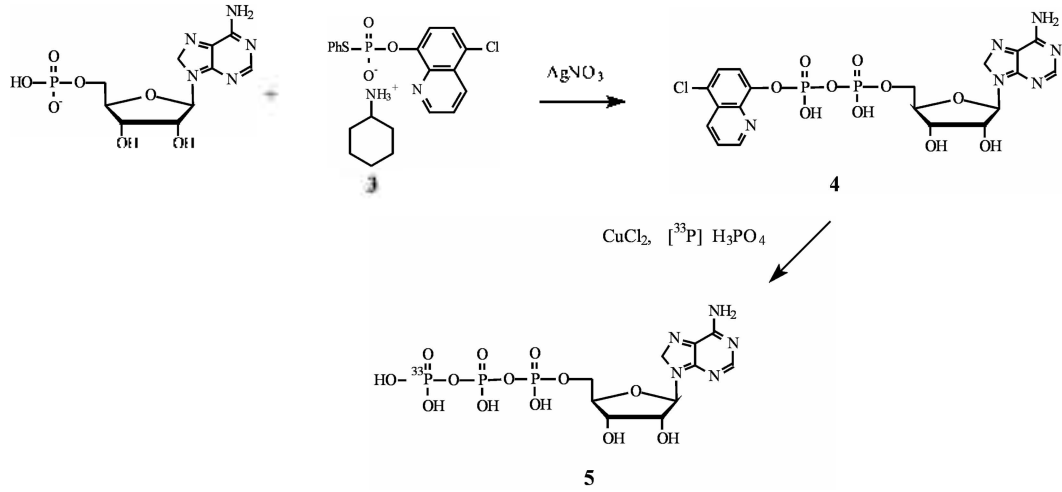
결과 및 고찰

짝지움 시약의 합성

Scheme 1과 같이 2 단계 과정으로 짝지움 시약(3)을 합성하였다. 화합물 (2)의 합성은 0. 질소 조건에서 실험을 하였다. 반응 진행시 Cl^- 과 피리딘이 반응한 피리딘염(현탁 침전물)이 생성된다. 이 피리딘염을 분리하지 않고 재결정 할 경우 용매와 생성물사이의 계면활성작용으로 화합물 (2)을 얻지 못하였다. 합성된 화합물 (2)는 연한노란색의 분말형태이며 메탄올에 약간 용해되고 HMPA와 DMSO에 쉽게 용해되었다. 화합물 (3)은 Tsujiaki Hata의 연구¹⁹를 참고하였으며 10 당량에 해당하는 페닐다이설파이드(phenyldisulfide)를 이용한 결과 화합물 (3)의 수율이 10% 미만으로 불순물도 많았다. 피리딘과 아세토나이트릴(acetonitrile) 혼합용매 조건하에 2.5 당량의 페닐다이설파이드로 화합물 (3)을 합성하였으며 TLC 결과 정량적 반응 진행을 확인하였다. 사용 용매의 양을 최소 조건으로 하여 페닐다이설파이드를 첨가하였으며, 반응물(화합물 (2))이 용매에 완전히 용해되는 것을 확인하고 트리부틸포스핀(tributylphosphine)을 첨가하여야 60% 이상의 높은 수율의 화합물 (3)을 얻을 수 있었다.

비교물질 ATP의 합성

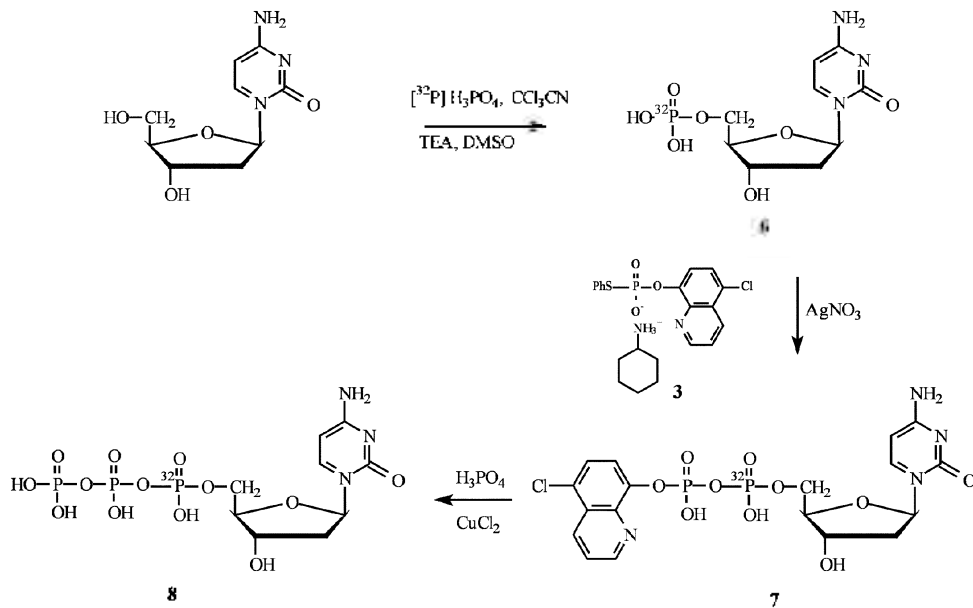
[32 P] γ -ATP(5)의 합성은 Scheme 2와 같으며 P-32 표



Scheme 2. Reaction step in the preparation of $[^{32}\text{P}]\ \gamma\text{-ATP}$ using chemical processing.

지화학물의 합성조건을 알아보기 위해 안정한 원소 (^{31}P)로 ATP를 합성하였다. ATP의 합성은 2단계 반응을 한 용기반응(One-spot Reaction)으로 진행하였다. 화합물 (4)의 확인은 Ag^+ 이 페닐설파이드기와 반응하여 생성되는 AgSPh 의 침전물로 간접 확인이 가능하며 TLC로 반응을 확인하였다. 침전물은 카트리지 필터(Nylon, pore size $0.45\ \mu\text{m}$)를 이용해서 제거하였다. 화합물 (4)의 퀴논릴기를 제거하기 위해 Cu^{2+} 를 사용

했으며 크기가 비슷한 Zn^{2+} 을 사용하여도 같은 결과를 얻었다. 합성한 ATP는 시판하는 ATP와 TLC 비교를 하여 확인하였다. 최적 분리 확인 조건은 $n\text{-BuOH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_3(1:1:1:1)$ 의 전개 용매를 사용했을 경우이며, ATP는 0.53, AMP는 0.70. 화합물 (3)은 0.85의 전개율을 나타내었다. Scheme 2와 같은 방법의 합성을 통해 P-32 표지 화합물을 합성할 수 있음을 확인하였다.



Scheme 3. Reaction step in the preparation of $[^{32}\text{P}]\ \alpha\text{-dCTP}$ using chemical processing.

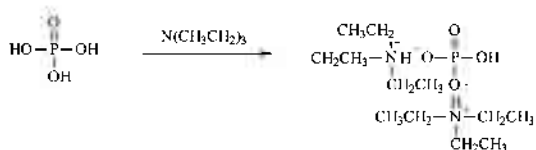


Fig. 2. Partially protected phosphoric acid with Triethylamine.

비교물질 dCTP 합성

^{32}P α -dCTP (8)의 합성은 Scheme 3과 같으며 표지 화합물은 합성하기 전에 안정한 원소를 이용하여 dCTP의 합성여부를 확인하였다. dCMP (6)의 합성에 있어서 H_3PO_4 는 세 위치의 작용기가 있어 CCl_4/CN 과 반응시 여러 부반응이 일어날 수 있다. 이와 같은 부반응으로 수득률 저하가 일어나므로 부분적 보호기 도입 과정이 필요하였다. 이를 해결하기 위해 트리에틸아민(triethylamine)을 이용한 부분적 보호기를 도입하였다. H_3PO_4 의 $\text{pK}_{\text{a}1}$, $\text{pK}_{\text{a}2}$, $\text{pK}_{\text{a}3}$ 는 각각 2.12, 7.21, 12.67로서 트리에틸아민($\text{pK}_{\text{a}} = 11.1$)을 첨가하면 H_3PO_4 의 두 작용기를 염 상태로 보호할 수 있다. 보호된 H_3PO_4 는 Fig. 2의 상태이며, 무수 반응조건에서 선택적 인산화 반응이 가능하였다. 한편, 피리딘의 pK_{a} 는 5.25로서 H_3PO_4 의 $\text{pK}_{\text{a}1}$ 과 $\text{pK}_{\text{a}2}$ 의 중간값을 가지며, 선택적으로 한 작용기를 보호할 수 있었다. 합성된 dCMP는 여러 용매조건에서 확인하였으며 최적 분리 확인 조건은 $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_4\text{OH} (1 : 4 : 5)$ 를 사용할 경우이며 dCMP는 0.55의 전개율을 나타내었다.

dCTP의 합성은 ATP의 합성과정과 유사한 방법으로 싹지움 시약을 이용하였다. TLC를 확인한 결과 $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH} : \text{H}_2\text{O} : \text{NH}_4\text{OH} (55 : 20 : 25)$ 용매 조건에서 전개율은 0.35이었으며, $n\text{-BuOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} : \text{NH}_4\text{OH} (1 : 1 : 1 : 1)$ 의 용매 조건에서 전개율은 0.50이었다. 이 두 전개 용매 조건에서 dCMP와 dCTP의 합성여부를 명확히 알 수 있었다.

^{32}P H_3PO_4 용액 분석

원자력 연구소에서 생산된 ^{32}P H_3PO_4 의 생산과정에서 존재할 수 있는 다른 이온들은 주로 생산에 이용되는 표적물질, 표적 용기 및 첨가된 화학물질에 의해 나타날 수 있으며, 표지화합물을 제작하는 과정에서 방해 요인으로 작용할 수 있다. 따라서 표지화합물의 합성 시 ^{32}P H_3PO_4 의 화학적 순도를 확인하였다. 완전히 감퇴된 ^{32}P H_3PO_4 를 사용했으며 습식분

Table 1. Analytical data of 10-fold diluted ^{32}P γ -ATP solution. Element-analysis is carried out with ICP-AES and anions are analyzed with spot test

Elements and Ions	Contents (ppm)	Elements and Ions	Contents (ppm)
Fe	0.8	Al	4
Na	10	Ba	0.4
Mg	1.6	Si	4
Ca	4	CO_3^{2-}	N.D
K	N.D	SO_4^{2-}	N.D
Cu	N.D	CN^-	N.D
Mn	0.4	ClO_3^{2-}	N.D
Zn	0.4	SCN^-	N.D
Cd	0.4	Cl^-	Detection

석에 의한 음이온 분석과 ICP-AES를 이용한 양이온 분석하였다. 음이온 분석결과 Cl^- , CN^- , ClO_3^- 가 존재하였으며 가장 많이 포함하는 이온은 Cl^- 이온임이 확인되었다. 양이온의 확인은 방사성 붕괴가 검출되지 않은 ^{32}P H_3PO_4 용액 1 ml을 20 배로 묽혀서 분석을 하였다. 그 결과 Na이 약 10 ppm, Ca이 4 ppm, Al이 4 ppm 그리고 Si 4 ppm으로 나타났다. 분석 결과 나타난 용액 속에 주로 존재하는 이온은 Cl^- 이온 및 Na^+ 이온이며 Cl^- 이온은 친핵치환 반응을 방해하지 않는 이탈기로 작용하므로 표지화합물 합성시 문제가 되지 않는다. 원자력연구소에서 생산되는 ^{32}P H_3PO_4 는 정제 없이 사용이 가능하다는 것이 확인되었다.

표지화합물 ^{32}P γ -ATP(5)의 합성

사용한 ^{32}P H_3PO_4 는 2 mCi/1 ml로 HCl 수용액 상태였으며, Scheme 2와 같은 과정으로 실험 조건에 따르는 합성수율의 변화는 다음 Table 2에 나타내었다. 3 차 증류수를 이용하여 5 배로 묽힌 후 실험을 한 결과로 수득률이 약 40%이었으며 ^{32}P H_3PO_4 를 묽히지 않고 반응 진행시 약 ^{32}P γ -ATP의 수율은 60%이었다. 갑압 증류하여 수분과 HCl을 제거하여 합성한 결과 수득률은 95% 이상이었다. 위 결과를 종합하면 ^{32}P H_3PO_4 순도 및 시약의 사용량에 따라 합성 수율의 변화가 나타났으며 수분의 함유량에 따른 수율의 변화는 가장 중요한 요소라고 할 수 있다. 최적조건인 합성방법은 건조시킨 ^{32}P H_3PO_4 를 이용하고 같은 당량의 전구체와 ATP, 2 당량의 질산은, 5 당량의 이염화구리를 사용한 실험 4 조건이었다. 합성된 ^{32}P

Table 2. Preparative conditions of [³²P] γ-ATP and its yield. [³²P] γ-ATP is identified by Radio TLC scanning

Exp.	Precursor Cpds (3) (mg)	AMP (mg)	Solvent MPD/IMPA	AgNO ₃	[³² P]-H ₃ PO ₄	CuCl ₂	Yield
Exp. 1	13 mg	10 mg	0.9 ml /0.3 ml	1.1 eq	5-fold Dilution 250 μl	5 eq	40%
Exp. 2	13 mg	10 mg	0.9 ml /0.3 ml	1.1 eq	100 μl	5 eq	60%
Exp. 3	13 mg	11 mg	0.9 ml /0.3 ml	1.5 eq	100 μl	5 eq	73%
Exp. 4	13 mg	11 mg	0.9 ml /0.3 ml	2 eq	100 μl	5 eq	95%
Exp. 5	13 mg	11 mg	0.9 ml /0.3 ml	5 eq	100 μl	5 eq	88%

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	0.3	9.9	6.1	0.085	354.0	354.0	2.51	3.07
Rgn 2	30.8	49.1	39.3	0.546	11181.0	11181.0	79.18	96.93
Bkg 1	57.8	77.9	64.9	0.901				
2 Peaks					11535.0	11535.0	81.69	100.00

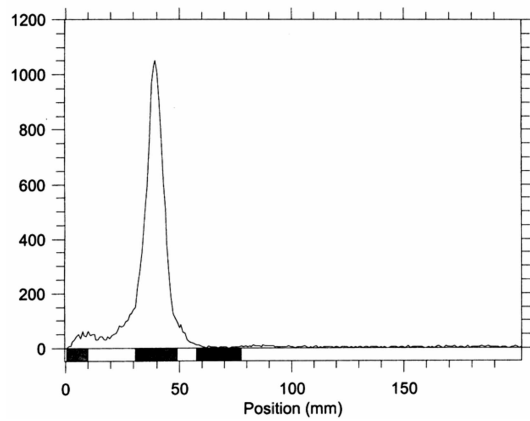


Fig. 3. Radio TLC Scanning chromatogram of [³²P] γ-ATP with n-BuOH : EtOH : H₂O : NH₃ (1:1:1:1) as eluents Free Phosphoric acid([³²P] H₃PO₄) and [³²P] γ-ATP are identified in R_f = 0.1 and 0.54.

γ-ATP의 라디오 크로마토그램은 Fig. 3와 같으며 표지수율은 97%로 재현성이 있는 결과를 얻었다.

표지화합물 [³²P] α-dCTP(8)의 합성

Scheme 3과 같은 과정의 [³²P] α-dCTP의 합성은 [³²P] dCMP의 합성과 똑같은 시약을 이용한 인산화로 진행된다. 사용한 [³²P] H₃PO₄는 3 mCi/ml의 HCl 수

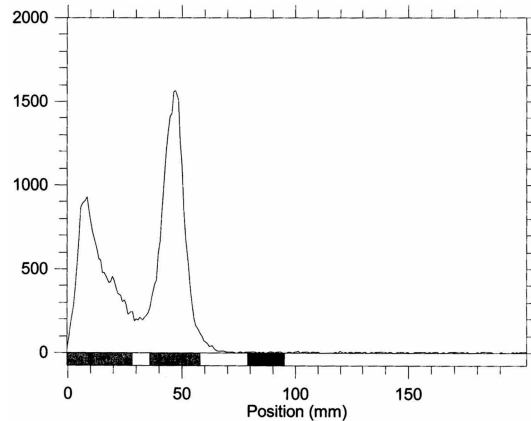


Fig. 4. TLC Scanning chromatogram of prepared [³²P] dCMP. (Distance from solvent front : 80 mm. Eluents: C₃H₇-OH : H₂O : NH₃OH=55 : 20 : 25. Radio chemical yield: 55%) : Free Phosphoric acid([³²P] H₃PO₄) and [³²P] dCMP are identified in R_f = 0.1 and 0.55.

용액 상태였으며 합성에 필요한 반응-용기는 14/20 joint가 붙은 시험관을 제작하여 사용하였다. [³²P] dCMP의 합성은 수분에 큰 영향을 받는다. [³²P] H₃PO₄의 수용액의 수분을 1회 제거 시 10~30%, 3회 제거 시 40~55%의 [³²P] dCMP의 수득율이 나타났다(Table 3, Fig. 4). 특히, 과량의 트리에틸아민을 사용할 경우 수득율이 낮은 것을 확인하였다. 최적 합성조건은 3회 건조시킨 [³²P] H₃PO₄를 사용하고 반응에 참여하지 않은 트리에틸아민을 제거할 경우이다. 합성한 [³²P]

Table 3. Preparative conditions of [³²P] α-dCMP and its yield. [³²P] α-dCMP is identified by Radio TLC scanning

Exp.	Deoxycytidine	CCl ₃ CN	DMSO	[³² P]H ₃ PO ₄	Yield	비고
Exp. 1	20 mg	8.2 μl	0.2 ml	0.1 ml (3 mCi)	-	
Exp. 2	20 mg	8.2 μl	0.2 ml	10 μl (0.03 mCi)	-	
Exp. 3	20 mg	8.2 μl	0.2 ml	0.1 ml (0.25 mCi)	30%	dried [³² P] H ₃ PO ₄
Exp. 4	20 mg	8.2 μl	0.2 ml	0.1 ml (0.3 mCi)	11%	dried [³² P] H ₃ PO ₄
Exp. 5	20 mg	3.0 μl	0.5 ml	0.1 ml (0.3 mCi)	42%	dried [³² P] H ₃ PO ₄
Exp. 6	20 mg	3.0 μl	0.2 ml	0.1 ml (0.3 mCi)	55%	dried [³² P] H ₃ PO ₄

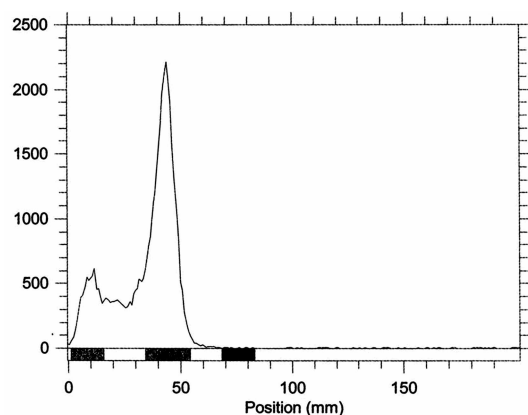


Fig. 5. TLC Scanning chromatogram of prepared $[^{32}\text{P}] \alpha\text{-dCTP}$. (Distance from solvent front : 90 mm, Eluents: *n*-BuOH : H_2O : MeOH : NH_4OH = 1 : 1 : 1 : 1, Radio chemical yield: 65%) : $[^{32}\text{P}] \alpha\text{-dCTP}$ was prepared using sep-pak filtered $[^{32}\text{P}] \text{dCMP}$. Free Phosphoric acid($[^{32}\text{P}] \text{H}_3\text{PO}_4$) and $[^{32}\text{P}] \alpha\text{-dCTP}$ are identified in R_f = 0.1 and 0.50.

dCMP는 sep-pak 카트리지를 이용하여 분리하였으며 짝지움 시약을 이용한 $[^{32}\text{P}] \alpha\text{-dCTP}$ 의 합성은 ATP 합성조건과 동일하게 진행하였다. 라디오 크로마토그래피로 확인한 결과 $[^{32}\text{P}] \alpha\text{-dCTP}$ (8)의 표지 수율이 65%이었으며(Fig. 5), 전 합성과정에 따르는 표지 수율은 약 40%이었다. $[^{32}\text{P}] \alpha\text{-dCTP}$ (8)의 합성은 $[^{32}\text{P}] \text{dCMP}$ 합성과정이 가장 큰 영향을 주고 있음을 확인하였다.

실 험

시약 및 기기

방사성 동위원소 ^{32}P 는 한국원자력 연구소에서 생산된 $[^{32}\text{P}] \text{H}_3\text{PO}_4$ 를 이용하였으며, 1-chloro-8-hydroxyquinoline, phenyl disulfide와 adenosine 5'-monophosphate는 Acrose사의 제품을, 질산은, 이염화구리(CuCl_2), H_3PO_4 는 Aldrich사의 제품을, 그 밖의 반응 용매들은 Aldrich 및 Merck사의 특급시약을 이용하였다. 방사성 동위원소를 이용한 실험을 위해 반응 초자기구는 Aldrich사의 KONTES MICROSCALE GLASSWARE KIT를 이용하여 간이 반자동합성장치를 제작하여 사용하였다. 합성 확인에 사용한 TLC는 Merck사의 Silica gel 60 F_{254} 를 이용하였으며 발색 기구 및 시약으로는 UV-램프 및 I_2 를 이용하였다. IR은 Bomem 100 FT-IR Spectrophotometer를, NMR은 Varian사의 Gemini 200을 이용하였으며

질량분석은 고려대학교 기초과학지원센터의 고성능 액체 크로마토그래피/질량분석기(FAB)를 이용하였다. 라디오 크로마토그래피는 Bioscan사의 System 200 imaging scanner와 AC-3000을 이용하였다. 양이온 분석을 위해 GBC Scientific Equipment Pty Ltd사(GBC Integra XMZ-Australia)의 ICP-AES를 사용했다.

5-Chloro-8-quinolyl phosphate (2)의 합성

질소 조건에서 피리딘과 1,4-다이옥산 농량의 혼합 용매(30 ml)에 POCl_3 3.11 ml를 녹인 후 1,4-다이옥산 10 ml에 용해시킨 5-chloro-8-hydroxy quinoline을 0°C 에서 소량씩 첨가한다. 5시간 동안 교반시킨 후 필터한 후 용액을 감압 증류하고 피리딘과 물(1 : 1) 혼합 용액 10 ml를 0°C 에서 천천히 첨가한다. 용매를 감압 증류 한 후 아세트나이트릴과 물(1 : 1) 혼합용액을 이용하여 1차 침전물을 얻었으며 아세트나이트릴을 이용하여 2차 재결정하여 수득율이 63%(1.8 g)인 화합물 (2)(5-chloro-8-quinolyl phosphate)를 얻었다.

TLC (*n*-BuOH : MeOH : H_2O : NH_4OH = 1 : 1 : 1 : 0.5): R_f = 0.25, mp = 127. ^1H NMR (DMSO): δ = 9.02(dd; 1 H, Ar-H), 8.55(dd; 1 H, Ar-H), 7.73(m; 3 H, 3Ar-H), 5.32 (broad; 2 H, 2 P-OH) MS(FAB, M + 1): $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClNO}_4\text{P}$ calcd. for 259.98 found 260.07.

O-8-(5-chloroquinolyl) S-phenyl phosphorothiate (3)의 합성

질소 분위기에서 1 g(3.86 mmol)의 화합물 (2)를 3 ml의 피리딘과 15 ml의 아세트나이트릴 용매에 첨가한다. 실온에서 2.1 g(9.65 mmol)의 페닐다이설파이드(phenyldisulfide)를 넣고 4.8 ml(19.30 mmol)의 삼부틸포스핀(tributylphosphine)을 천천히 가한다. 1시간 반응 뒤 용매를 제거한 후 클로로포름용액을 이용하여 유기물을 추출한다. 생성 혼합물을 다이클로로메탄에 녹인 후 아세트나이트릴과 0.88 ml (7.72 mmol)의 사이클로헥실아민을 첨가하여 -20°C 에서 재결정시켜 연한 노란빛을 띠는 백색결정의 생성물을 합성하였으며, 수득율은 68%(1.18 g)이었다.

TLC(MC : MeOH, 7 : 3): R_f = 0.65. ^1H NMR(CD_3OD): δ = 8.86(dd; 1 H, quinoline-H), 8.67(dd; 1 H, quinoline-H), 7.89(dd; 1 H, quinoline-H), 7.69(q; 1 H, quinoline-H), 7.65(d; 1 H, quinoline-H), 7.40(m; 2 H, 2Ar-H), 7.20(m; 1 H, Ar-H), 7.13(m; 1 H, 2Ar-H), 5.32(broad;

2 H, 2 P-OH). MS(FAB, M+1): $C_{21}H_{24}ClN_2O_3PS$ calcd. for 451.09 found 451.20.

비교물질 ATP(5)의 합성

동량의 1-메틸피롤리돈(MPD)과 헥사메틸포스포아마이드(HMPA) 혼합 용매 6 ml에 100 mg(0.22 mmol)의 화합물 (3)과 77 mg(0.22 mmol)의 AMP(Adenosine monophosphate)를 첨가하여 10분 간 교반한 후 45 mg(0.26 mmol)의 질산은을 넣어 30분 간 반응을 진행한다. 합성된 화합물(4)은 분리하지 않고 연속하여 38 μ l(0.66 mmol)의 인산과 150 mg(1.1 mmol)의 이염화구리($CuCl_2$)를 첨가 후 12시간 동안 반응을 진행시켰다. 합성된 ATP는 TLC를 이용하여 확인하였다.

TLC (*n*-BuOH : MeOH : H₂O : NH₄OH = 1 : 1 : 1 : 1); R_f = 0.54.

비교물질 dCMP 및 dCTP의 합성

질소 분위기하에서 30(0.5 mmol)의 인산에 아세트나이트릴을 첨가하고 감압 증류를 2회 진행한다. 1 ml(7 mmol)의 트리에틸아민을 첨가하여 감압 증류한 뒤 200 μ l의 아세트나이트릴을 첨가한다. 다른 반응용기에 20 mg(0.08 mmol)의 데옥시시티딘(deoxycytidine monohydrate)을 넣은 후 아세트나이트릴을 이용하여 수분을 제거한다. 200 μ l의 DMSO와 100 μ l(1 mmol)의 삼염화아세트나이트릴(CCl_3CN)를 첨가하고 교반 후 인산이 들어있는 반응용기에 옮겨 40 °C에서 30분 간 방치한다. 합성된 화합물 (6)은 시판하는 dCMP와 TLC로 비교하였다. 생성 혼합물 (6)을 감압 증류하여 한 뒤 1-메틸피롤리돈과 헥사메틸포스포아마이드의 1 : 1 혼합 용매 4 ml를 첨가한 후 45 mg(0.26 mmol)의 질산은과 100 mg(0.22 mmol)의 화합물 (3)을 첨가하고 30분간 교반시킨다. 계속하여 30 μ l(0.5 mmol)의 인산과 100 mg(0.73 mmol)의 이염화구리를 첨가한 후 상온에서 12시간 반응을 진행한다. 합성된 dCTP는 시제품과 TLC비교를 하여 확인하였다.

TLC (C_3H_7OH : H₂O : NH₄OH = 11 : 4 : 5); dCMP (R_f = 0.55), dCTP (R_f = 0.35)

TLC (*n*-BuOH : MeOH : H₂O : NH₄OH = 1 : 1 : 1 : 1); dCTP (R_f = 0.50)

표지화합물 [³²P] γ -ATP(5)의 합성

β 선 차폐체로서 10 mm 아크릴 판을 이용하였으며

제작된 Microscale vial를 이용하여 합성을 진행하였다. 0.9 ml의 1-MPD와 0.3 ml의 HMPA의 용매에 13 mg(0.029 mmol)의 화합물 (3)과 10 mg(0.029 mmol)의 AMP를 첨가하고 10분 간 교반시킨 후 10 mg(0.058 mmol)의 질산은을 첨가하여 30분간 교반시킨다. 아세트나이트릴을 이용한 불변혼합 증류를 통해 2회 건조시킨 0.2 mCi의 [³²P] H₃PO₄에 위 혼합용액을 섞은 후 19 mg(0.14 mmol)의 이염화구리를 첨가하고 3 시간 교반하여 [³²P] γ -ATP(5)를 합성하였다. 합성확인 및 표지 수율은 라디오크로마토그램을 이용하였다.

TLC (*n*-BuOH : MeOH : H₂O : NH₄OH = 1 : 1 : 1 : 1); R_f = 0.54. Radiochemical yield: 95%.

표지화합물 [³²P] dCMP(6)의 합성

10 mm 아크릴 판으로 β 선 차폐한 조건에서 14/20 연결고리가 달린 시험판에 0.3 mCi (100 μ l) [³²P] H₃PO₄를 취한다. 100 μ l의 트리에틸아민을 첨가 하고 1 ml의 아세트나이트릴을 이용하여 30 °C 조건에서 3회 감압 증류하고 고무마개로 밀봉시킨다. 다른 반응용기에 20 mg(0.08 mmol)의 데옥시시티딘(deoxycytidine monohydrate)을 넣은 후 100 μ l의 DMSO와 3 μ l의 삼염화아세트나이트릴(CCl_3CN)를 첨가하고 교반 후 밀봉된 인산용기에 옮겨 40 μ l 조건에 30분간 방치한다. 합성확인 및 표지 수율은 라디오크로마토그램을 이용하였다.

TLC (C_3H_7OH : H₂O : NH₄OH = 11 : 4 : 5); R_f = 0.55. Radiochemical yield: 55%.

표지화합물 [³²P] α -dCTP(8)의 합성

화합물 (6)를 sep-pak 분리 후 동량의 1-메틸피롤리돈과 헥사메틸포스포아마이드 4 ml를 첨가한다. 13 mg의 화합물 (3)을 첨가한 후 10 mg의 질산은을 첨가 후 30분간 교반시킨다. 계속하여 30 μ l(0.5 mmol)의 인산과 100 mg(0.73 mmol)의 이염화구리를 첨가한 후 3시간 동안 반응하여 [³²P] α -dCTP를 합성하였다.

TLC (*n*-BuOH : MeOH : H₂O : NH₄OH = 1 : 1 : 1 : 1); dCTP (R_f = 0.50). Radiochemical yield: 65%.

결 론

O-8-(5-chloroquinoly)l S-phenyl phosphorothiate의 총 합성수율은 42%이었으며 합성 확인은 NMR, IR, TLC

를 이용하였다. 화합물 (3)을 이용한 [32 P] γ -ATP의 합성은 최적 조건하에서 95% 이상의 높은 표지 수율을 얻었으며 총 합성 시간은 4시간이 소요되었다. [32 P] α -dCTP의 합성은 총 합성 수율은 약 35-40% 정도였다. 합성 시간은 총 6시간이 소요되었다. 화학적 합성을 통한 P-32 표지화합물의 제작은 [32 P] γ -ATP(α 위치 표지)의 경우 높은 수득율을 얻었으며, [32 P] α -dCTP(α 위치 표지)의 합성은 [32 P] dCMP 합성에 크게 의존하며 Sep-pak 분리 시 손실이 있었다. 이와 같은 합성법은 기존 효소반응과 비교하여 반응시간이 짧게 소요된다. 특히, [32 P] γ -ATP의 경우 경제성과 효율성이 좋다고 판단되며 대량생산체계가 가능하다고 사료된다.

본 연구는 원자력연구개발과제 중 하나로 이용 연구지원사업의 지원에 의해 수행되었으며, 연구 수행에 도움을 준 원자력의학원 싸이크로트론응용연구실에 감사의 글을 드립니다.

인용문헌

1. 한국원자력산업회의, 2003 Nuclear Energy Yearbook, Korea, 2003, 242.
2. Fumio Hayashi, Osamu Hatano and Takao Shinozawa, *Radioisotopes*, 1987, 36, 347.
3. Barai, V.N.; Zinchenko, A.I.; Zalashko, L.M.; Eroshchinskaya, L.A. and Mikhailopulo, I.A. *Biotechnology letters*, 1995, 17(6), 599.
4. Inwon Park and Tae-Neung Johng, Purification of Home-made 32 P- H_3PO_4 and its Application to the Synthesis of [α - 32 P]ATP, *Korean Biochem. J.*, 1984, 17(1), 80.
5. 沈德恒, 王美中, [α - 32 P]dCTP의制備, *Journal of Nuclear and Radiochemistry*, 1991, 13(1), 44.
6. Anna Janecka. Methods of preparation of nucleosidetriphosphate labeled with phosphorus-32 in Alfa and gamma position, *Post. Biochem.*, 1983, 29, 377.
7. Johnson, R.A and Walseth, T.F (BrookeG., Greengard, P. and Robinson, G.A., Ed.): "Advances in Cyclic Nucleotide Research", 1979, 10, 135.
8. Grossman, I. and Moldave K., (Maxam, A.M and Gilbert, W). *Methods in Enzymology*, 1980, 65, 490.
9. Symons, R.H. *Methods in enzymology*, 1974, 29, 102.
10. Symons, R.H. *Nucleic acids Reserch*, 1977, 4(12), 4347.
11. Friedrich Cramer and Gunter Weimann, *Chem. Ber.*, 1961, 94, 996.
12. Donald E. Hoard and Donald G. Ott, *Journal of the American Chemical Society*, 1965, 87(8), 1785.
13. J. Zimmet, L. Jarlebark, R. Hammarberg, P.J.M. von Gslm, K.S. Jsvobdon, and E. Heilbronn. *Nucleosides & Nucleotides*, 1993, 12(1), 1.
14. Hiroshi Takaku, Ryuichi Yamaguchi, and Tadaaki Nomoto, *Tetrahedron Letters*, 1979, 40, 3857.
15. Hiroshi Takaku, *Chem. Pharm. Bull.*, 1977, 25(8), 2121.
16. Hiroshi Takaku, Toshimi Konishi, and Tsujiaki Hata, *Chemistry Letters*, 1977, 655.
17. Koichiro Fukuoka, Fuminori Suda, Masahide Ishikawa, and Tsujiaki Hata. *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 693.
18. Hiroshi Matsuo, Tomohisa Morguchi, Toshimitsu Takabe, Stephen Buratowski, Mitsuo Sekine, Yoshimasa Kyogoku, and Gerhard Wagner. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 2417.
19. Tsujiaki HATA and Mitsuo SEKINE, The synthesis of S-phenyl nucleoside phosphorothioates, *Chemistry Letters*, 1974, 837.